



酸化ストレス動物モデルの確立とカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用

著者	鈴木 晃一郎
号	51
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1124号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122755

すずき こういちろう

氏名（本籍地） 鈴木 晃一郎

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第 1124 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科，専攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論文題目 酸化ストレス動物モデルの確立とカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用

博士論文審査委員 （主査）教授 宮澤 陽夫

教授 桑原 重文

教授 山下 まり

准教授 仲川 清隆

論文内容要旨

酸化ストレス動物モデルの確立と
カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用

Establishment of oxidative stress model animals
and *in vivo* antioxidant effect of dietary cacao polyphenols

東北大学大学院農学研究科
生物産業創成科学専攻

鈴木 晃一郎

指導教員 宮澤 陽夫 教授

目次

序論	1
第一章	
アルコール性脂肪肝の酸化ストレス評価と カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明	3
第二章	
非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス肝臓の 酸化ストレス評価	6
第三章	
四塩化炭素が肝臓と腎臓に及ぼす酸化ストレス評価と カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明	8
総括	11
引用文献	12

序論

食の欧米化、ストレスの多い社会環境、高齢化により、生体内で活性酸素が過剰に産生され、生活習慣病の様な疾患を引き起こすことが示唆されている。これに伴い、身体の成分の酸化抑制効果すなわち生体内抗酸化作用を持つ食品成分の関心が高まっている。

食品成分の生体内抗酸化作用を証明するためには、生体内の酸化ストレスを人為的に有意に増加させた動物モデルが必要となる。実験動物に酸化ストレスを誘発する方法は幾つか報告されており、大別すると3つに分類することができる[1]。1つは抗酸化物質が欠損した食餌や、活性酸素が発生する食品成分を投与する方法。これはビタミンE欠乏飼料や[2]、アルコール含有飼料[3]を用いた実験系が挙げられる。2つ目は遺伝子改変や薬剤投与により、酸化ストレスに起因する疾患を誘発させる方法。これは心筋症[4]や、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) [5]を誘発させる実験系が挙げられる。最後は活性酸素を発生する毒性物質を投与する方法であり、パラコート[6]や四塩化炭素 (CCl₄) [7]を用いた実験系が挙げられる。実験動物の生体内酸化ストレスは、チオバルビツール酸 (TBA) が過酸化脂質から生成するマロンジアルデヒド(MDA) と反応して生成するチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) を比色法で定量した報告が多い。しかし TBA はMDA 以外の物質とも反応することが知られており、またサンプル調製や発色の加熱工程でMDAが増加する可能性が指摘されているため[8]、生体内の酸化ストレスを正しく評価していない場合がある。

私たちの研究室では細胞膜の主要構成リン脂質 (ホスファチジルコリン) の酸化一次生成物である過酸化リン脂質 (PLOOH) (Fig. 1) を高選択的に測定できる化学発光検出HPLC (CL-HPLC) 法を開発した (Fig. 2)。生体内に蓄積する PLOOH は生体内の酸化ストレスを直接反映するため、CL-HPLC 法により食品成分の生体内抗酸化作用を直接的に評価することができる。

カカオはチョコレートやココアの原料として世界中で広く食されている。またポリフェノール含量が豊富な作物として生体内抗酸化作用が期待されている。しかし既存研究では十分な科学的根拠が得られていない。例えば、Serafini らはカカオポリフェノールの含有率を高めたチョコレートを摂取したヒトの血液の抗酸化力が有意に増加したことを報告したが[9]、抗酸化力の指標とした測定方法 (FRAP 法) はferric-tripyridyltriazine の還元力を評価しており、生体内の抗酸化力を直接的に評価したとはいえない。またBaba らはカカオポリフェノールの含有率を高めたココアを12週間摂取したヒト血液中のLDLの抗酸化力が有意に増加したことを報告したが[10]、生体内に存在しない2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH) 由来のラジカルの消去能を抗酸化力とみなしており、生体内の抗酸化力を直接的に評価したとはいえない。

本研究は、代表的な酸化ストレス誘発方法を施した実験動物の過酸化脂質をCL-HPLC法で定量し、酸化ストレス動物モデルの確立を目指した。酸化ストレス誘発方法は過去の検証報告例が比較的多かった、アルコール含有液体飼料投与法、Streptozotocin(STZ) 投与によるNASH誘発法及びCCl₄腹腔内投与法を選択した。アルコール含有液体飼料投与法とCCl₄腹腔内投与法の予備実験時にPLOOHの有意な増加が確認できた為、本実験でカカオポリフェノールを多く含むカカオ抽出物 (CPE) を給与し、CPEの生体内抗酸化作用を明らかにした。

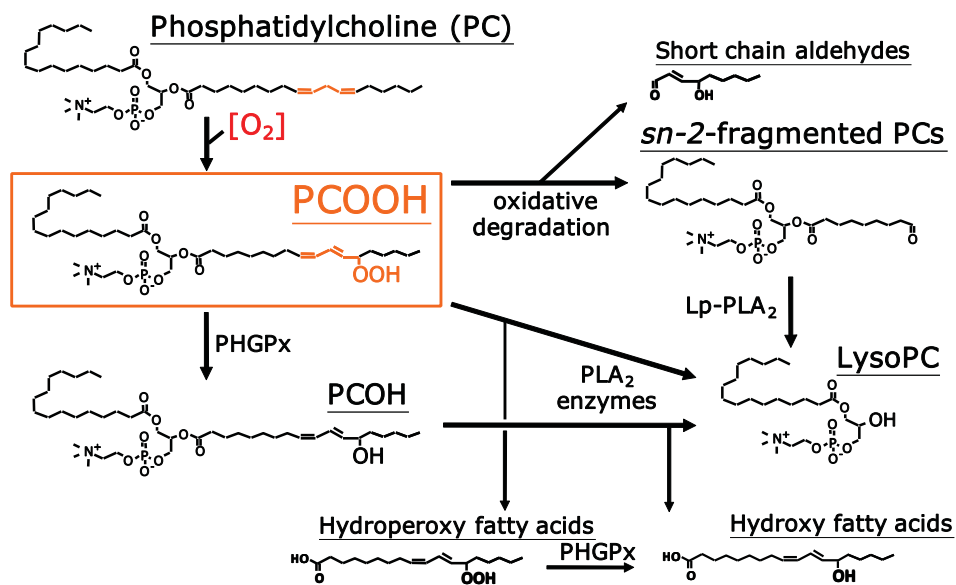


Fig. 1 Representative chemical structures of oxidized phospholipids formed during oxidation of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in vivo

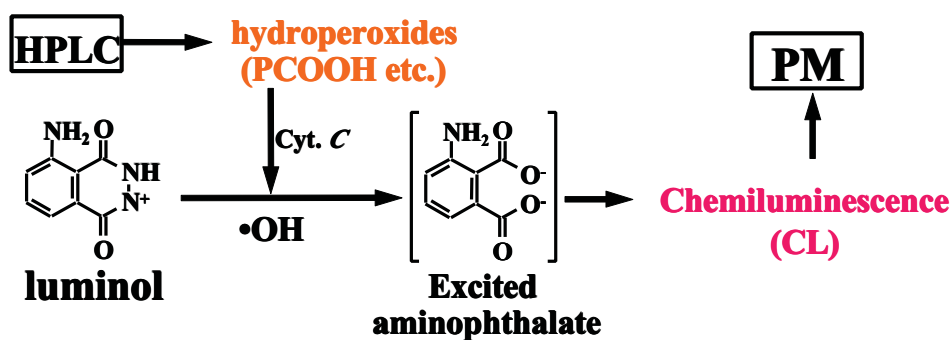


Fig. 2 Hydroperoxide-dependent chemiluminescence produced by luminol oxidation during the reaction of hydroperoxide with cytochrome C

第1章 アルコール性脂肪肝の酸化ストレス評価とカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明

【目的】アルコールを摂取すると脂肪酸の合成促進と脂肪酸の燃焼抑制が起こり、アルコール性脂肪肝が形成される[11]。アルコール性脂肪肝は肝線維症や肝硬変といった症状の進行に伴い、肝臓中に過酸化脂質が蓄積されてくることが疫学調査 動物実験において明らかになってきた[12][13]。しかしアルコール性脂肪肝と過酸化脂質の関係を調べた報告は殆どない。アルコール性肝障害の研究では、5%のアルコールを含む液体飼料をラットへ与えると比較的簡便に脂肪肝が現れることから、この実験系が疾病の解析や予防成分の研究にしばしば用いられている。そこで本研究ではアルコール含有液体飼料をラットへ与え、肝臓の脂質成分やPLOOHの変動から、アルコール性脂肪肝への酸化ストレスの関わりを明らかにし、アルコール実験系が酸化ストレスモデルとして適しているか評価した。またCPEをアルコールとともに与え、CPEのアルコール性脂肪肝への影響を評価した。

【方法と結果】Wistar系雄性ラット（6週齢）を4群（n=10）に分け、液体飼料（5%のアルコールを含む）をペアフィーディング投与した（Table. 1）。この4群をnon-ethanol+control, non-ethanol+cacao, ethanol+control, ethanol+cacaoに分類した。CPEは、カカオニブからアセトン抽出したパウダー（CP含有率61%）を、液体飼料に0.1%溶解させて給与した。液体飼料投与4週後各群3匹を16時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で肝臓を摘出し生理食塩水で灌流した。投与8週後、各群7匹の肝臓を同様に摘出した。肝臓を1mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)と0.9%の塩化ナトリウム(NaCl)を含む緩衝液でホモジネートし、Folch法で総脂質を抽出した。Folch抽出物中のトリアシルグリセロール(TG)量をWakoのキット（トリグリセライド E-テストワコー）で測定した。PLOOHはCL-HPLC法で定量した。レチノールはSchäfferらの方法で定量した[14]。 α -トコフェロールはPratesらの方法で定量した[15]。

投与4週後と8週後の各群の平均体重に差は見られなかった（Table. 2）。またカロリー摂取量も各群で差は見られなかった（Table. 2）。投与4週後からアルコール性脂肪肝に特徴的なTGの蓄積と、レチノールの減少が認められた（Table. 2）。8週後にPLOOHの有意な増加と、抗酸化物質である α -トコフェロールの減少が観察された（Fig. 3）。一方アルコールとともにCPEを含む液体飼料をラットに与えると、レチノールは同様に減少したものの、TGの蓄積は軽減され（Table. 2）、PLOOHの増加と α -トコフェロールの減少も認められなくなった（Fig. 3）。

【考察】平均体重とカロリー摂取量に差が見られなかったことから、ペアフィーディングは適切に行われたと考えられた。アルコール性脂肪肝に特徴的な症状である肝臓TGの蓄積とレチノールの減少が確認できたので、アルコール性脂肪肝モデルが作成できたと考えられた。アルコール実験系では、アルコール投与4週後では酸化ストレスをあまり伴わずに脂肪肝が形成され、8週後に酸化ストレスを伴って病状が進展する可能性が考えられた。よってアルコールを8週間投与したラット脂肪肝は酸化ストレス動物モデルに適用できると考えられた。CPEを給与すると、レチノールの減少は抑制できなかったが、 α -トコフェロールの減少とPLOOHの増加が抑制されたので、CPEが生体内で抗酸化作用を発揮したと考えられた。この作用はCPEが直接的に抗酸化力を発揮したというよりも、肝臓へのTGの蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減している可能性が考えられた。

Table. 1 Composition of the alcohol and non-alcohol liquid diets supplemented with or without CPE.

	Non-alcohol		Alcohol	
	Control	CPE	Control	CPE
<i>Caloric ingredients (energy %)</i>				
Protein	17.0	17.0	17.2	17.2
Carbohydrates	47.0	47.0	10.5	10.5
Fat	36.0	36.0	36.5	36.5
Ethanol	-	-	35.8	35.8
Total	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Non-caloric ingredients (g/L)</i>				
Cacao polyphenol	-	1.4	-	1.4
Vitamin mix	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineral mix	8.8	8.8	8.8	8.8

Table. 2 Body weight, food intake, and liver parameters of in the liver of rats fed a liquid alcohol diet with and without CPE for 4 and 8 Weeks. Data points represent the mean \pm SD. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-alcohol group ($p < 0.05$).

	4 weeks (n=3)				8 weeks (n=7)			
	Non-alcohol		Alcohol		Non-alcohol		Alcohol	
	Control	CPE	Control	CPE	Control	CPE	Control	CPE
Initial weight (g)	173.2 \pm 10.7	174.0 \pm 9.4	174.8 \pm 7.2	176.0 \pm 6.7	169.8 \pm 6.5	170.1 \pm 6.3	170.1 \pm 6.5	169.9 \pm 6.2
Final weight (g)	206.1 \pm 15.4	205.6 \pm 4.3	207.8 \pm 11.9	212.5 \pm 24.2	270.0 \pm 6.1	279.4 \pm 17.4	278.5 \pm 18.8	280.9 \pm 4.0
Carorie intake (kcal/kg weight)	208.7 \pm 6.7	208.1 \pm 7.4	199.5 \pm 3.3	195.2 \pm 6.9	208.4 \pm 8.7	212.3 \pm 10.6	203.2 \pm 9.3	209.6 \pm 6.3
Ethanol intake (g/kg weight)	-	-	10.0 \pm 0.2	9.8 \pm 0.3	-	-	10.2 \pm 0.5	10.5 \pm 0.3
Cacao polyphenol intake (mg/kg weight)	-	285.4 \pm 10.1	-	267.8 \pm 9.4	-	291.3 \pm 14.5	-	287.5 \pm 8.7
TG (mg/g of liver)	10.1 \pm 2.5	7.4 \pm 1.5	18.7 \pm 4.2 [#]	23.8 \pm 1.1 ^{* #}	13.9 \pm 4.6	12.9 \pm 4.6	25.9 \pm 3.9 [#]	14.7 \pm 2.8 [*]
Retinol (μ g/g of liver)	355.4 \pm 33.8	355.8 \pm 47.1	154.1 \pm 47.6 [#]	101.8 \pm 23.0 [#]	100.2 \pm 33.4	133.3 \pm 22.9 [*]	38.8 \pm 9.3 [#]	52.1 \pm 12.2 [#]

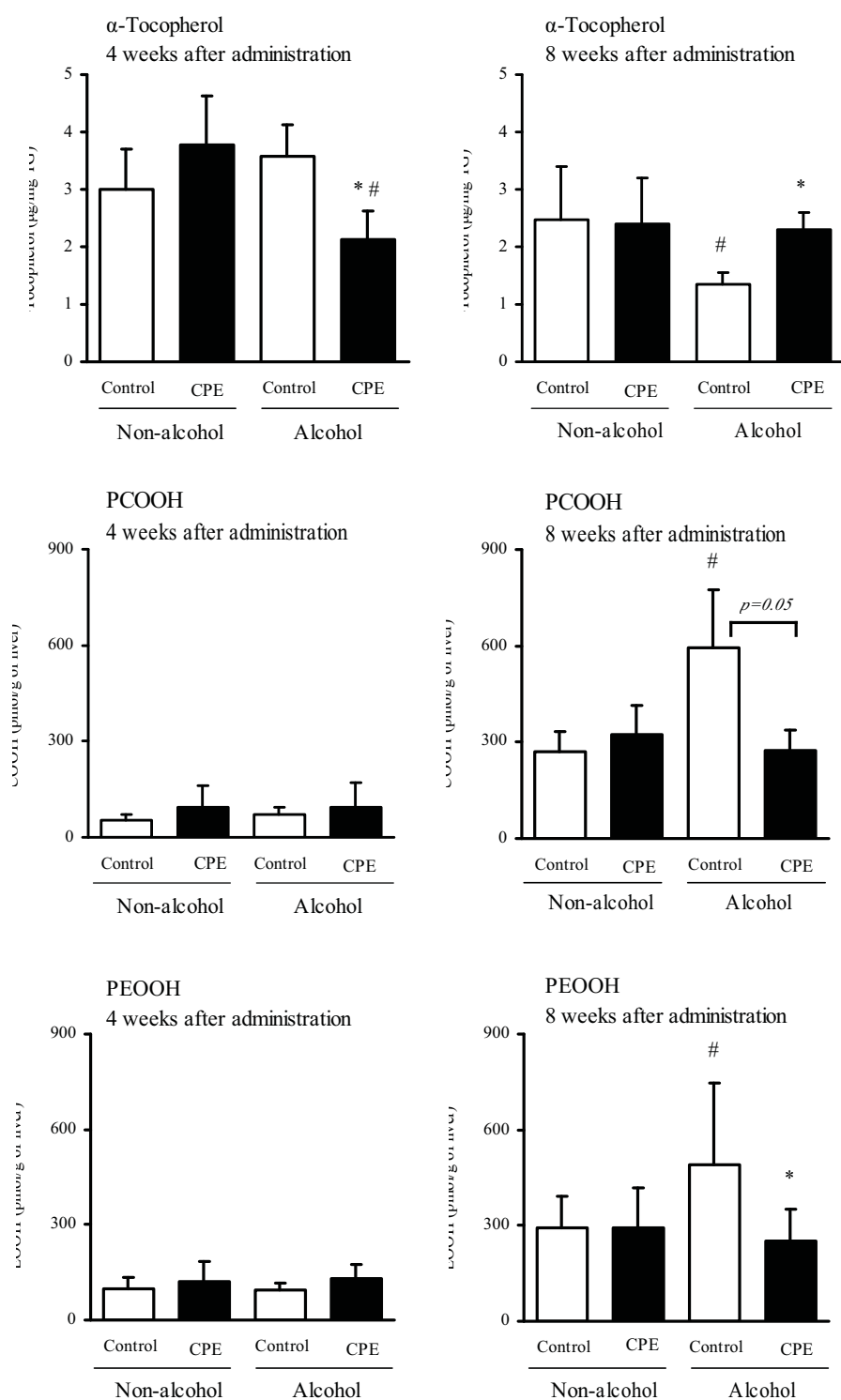


Fig. 3 Levels of α -Tocopherol and PLOOH (PCOOH and PEOOH) in the liver of rats fed a liquid alcohol diet with and without CPE. Data points represent the mean \pm SD. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-alcohol group ($p < 0.05$).

第2章 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス肝臓の酸化ストレス評価

【目的】近年、メタボリックシンドロームと密接に関わる、生活習慣を起因とした非アルコール性脂肪性肝疾患の有病率が急増している。過食と慢性的な運動不足が要因となり単純性脂肪肝が形成され、この状態が続くと肝臓の炎症や線維化が発症し非アルコール性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis：NASH）に進展する。NASHモデル動物やヒト患者の肝臓では過酸化脂質の増加が報告されており[16][17]、酸化ストレス病状進行に重要な役割を果たしていると考えられている。そこでNASHモデルマウス肝臓の過酸化脂質を定量し、酸化ストレス動物モデルとしての有用性を評価した。

【方法と結果】NASHモデルマウスの作成は株式会社ステリック再生医科学研究所で行われた。0週齢の雄性C57BL/6JをNASH群とcontrol群の2群(n=6)に分け、NASH群にはStreptozotocin（STZ）200 μ gを腹腔内投与した。control群は生理食塩水を腹腔内投与した。4週齢から7週齢まで両群に粗脂肪分32%の高脂肪食（HFD32：CLEA Japan）を投与した。7週齢時に肝臓を摘出し、Folch抽出物中のTGと過酸化脂質を定量した。TGはWakoのキットで定量した。過去のNASH酸化ストレス研究の多くは脂質過酸化二次生成物のMDAの反応物質TBARS値を指標にしていたので、本実験でもPLOOHに加えMDAを定量し、脂肪肝の過酸化進行度を詳細に確認した。本実験のTBARS定量はHPLC法を用いることで定性・定量性の精度を高め、更に抗酸化物質のbutyl hydroxytoluene（BHT）を加えることで、従来のTBARS法で指摘されていた非特異的検出の問題点と、加熱工程中の人為的な反応物質の増加を最小限に抑えた[18]。またFolch抽出物を固層抽出（SepPak NH2 1cc, Waters）で抗酸化物質を除去することで、CL-HPLC法の感度を高めて定量した。

NASH群のTGはcontrol群と比較し有意な増加が確認されたが（Fig. 4）、PCOOHとTBARSは差が認められなかった（Fig. 5）。

【考察】NASH群の肝臓中のTG量は 54.8 ± 5.4 mg/g liverを示した。これは第1章のアルコール性脂肪肝（ 25.9 ± 3.9 mg/g liver）よりもTG蓄積が進行していたが、PLOOHとTBAの高まりは確認できなかった。TG量と過酸化脂質量が相関しなかったため、脂肪肝の発症誘因の違いにより過酸化脂質の発生機序が異なる可能性が考えられた。

過去の研究から、アルコールや脂肪酸が肝臓に流入する量が増加すると、代謝酵素のCYP2E1が活性化され活性酸素を産生し、過酸化脂質の形成が進行すると考えられている[19][20]。すなわちアルコール性脂肪肝とNASHの過酸化脂質の発生機序には共にCYP2E1が関係すると考えられている。

一方Nakajimaらの研究で、高脂肪食投与、高脂肪食とアルコール投与、または普通食とアルコールを投与したラット肝臓のCYP2E1タンパク質発現量を比較し、高脂肪食投与群または普通食とアルコール投与群よりも高脂肪食とアルコール投与群のCYP2E1が最も強く活性化されていたことを報告した[21]。本実験結果はNakajimaらの報告と比較的よく一致しており、第1章のアルコールと高脂肪食を組み合わせたアルコール投与ラットの方が、本NASHモデルマウスよりも肝臓のCYP2E1が強く活性化され、脂質過酸化を増加させた可能性が考えられた。本実験で用いた7週齢時の肝臓では過酸化脂質の高まりが確認できなかったため、NASHモデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適應するには、飼育期間を延長して病状を進展させてから検証する必要があると考えられた。

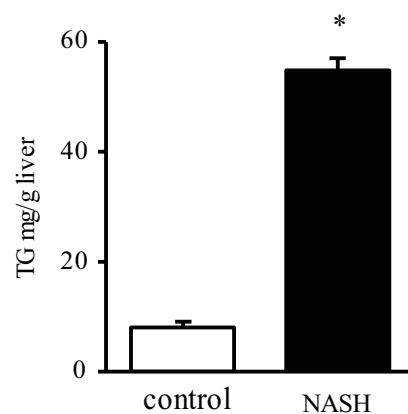


Fig. 4 Levels of triglyceride in the liver of STZ-treated rats. Data points represent the mean \pm S.E.M. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.01$).

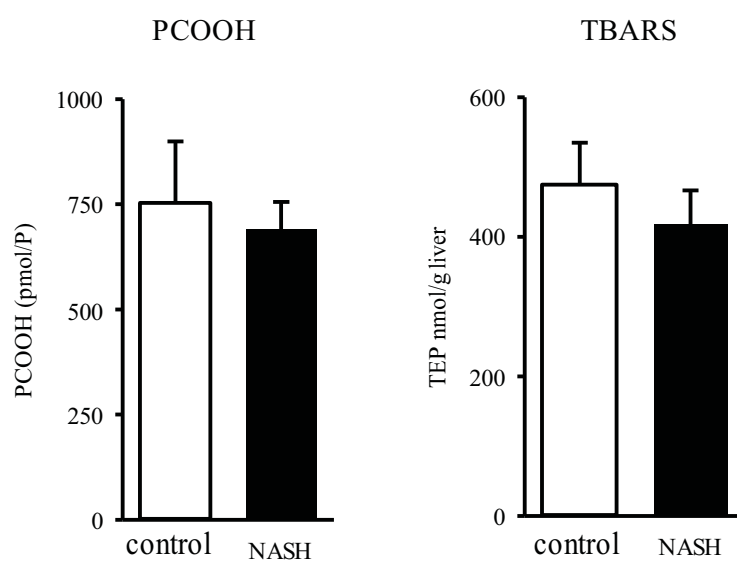


Fig. 5 Levels of PCOOH and TBARS in the liver of STZ-treated rats. Data points represent the mean \pm S.E.M.

第3章 四塩化炭素が肝臓と腎臓に及ぼす酸化ストレス評価とカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明

【目的】CCl₄は生体内でラジカルを産生し臓器障害を惹起する[22]。そのため酸化ストレスを誘発する薬剤としても注目され、CCl₄を用いた酸化ストレス動物実験は数多く報告されてきた。近年 National Institute of Environmental Health Sciences はCCl₄腹腔内投与2時間後のラット血漿の酸化ストレスが増加したことをGC-MSを用いて評価したが[7]、臓器の酸化ストレスについて報告は無かった。CCl₄は肝臓と腎臓に酸化ストレスをもたらすことが報告されているが[23]、大半の研究は肝臓に焦点を当てており腎臓についての報告は少ない。そこで本研究ではCCl₄腹腔内投与2時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスをCL-HPLC法とFL-HPLC法で評価し、最適な標的臓器を明らかにしようとした。また肝臓と腎臓のCCl₄酸化ストレスに対するCPEの影響を評価した。

【方法と結果】Fisher系雄性ラット（12週齢）20匹をCPE給与群と蒸留水給与群に分けた。CPEを7日間303mg/kg/day経口投与した。24時間絶食後、菜種油と混合したCCl₄を1200mg/kg腹腔内投与した。対照群は菜種油のみ投与した。腹腔内投与2時間後に血漿、肝臓及び腎臓を採取した。血漿成分は血液自動分析装置（長浜ライフサイエンスラボラトリー委託）で測定した。肝臓と腎臓のタンパク質はLowry法で測定した。TGはFolch抽出物をWakoのキットで定量した。リン脂質(PL)はBartlett法で測定した。 α -トコフェロールはSchäfferらの方法で定量した。グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性はキット(Biovision)を用いて定量した。*CYP2E1*発現量の解析は定量RT-qPCR法を用いた。固層抽出で抗酸化物質を除去したFolch抽出物をCL-HPLC法に供しPCOOHを定量した。TBARSはLC-FL法で定量した。

Water+CCl₄群は血中の逸脱酵素と尿酸値が有意に増加した (Table. 3)。また腎臓でタンパク質とPLの有意な低下とTGの有意な増加がみられたが、肝臓では変化が見られなかった (Table. 3)。過酸化脂質のPLOOHとTBARSは肝臓では増加しなかったが、腎臓で有意に増加した (Fig. 6)。*CYP2E1*のmRNAは肝臓と腎臓で有意に減少していた (Table. 4)。GPx活性は肝臓と腎臓で有意に減少していた (Table. 3)。 α -トコフェロールの減少は肝臓よりも腎臓で顕著にみられた (Table. 3)。CPE+CCl₄群では、血中の逸脱酵素と尿酸値の増加が抑制された (Table. 3)。また腎臓のタンパク質とPLの有意な低下が抑制された (Table. 3)。腎臓のPLOOHとTBARSが有意に抑制された (Fig. 6)。肝臓と腎臓の*CYP2E1*のmRNAの減少が抑制された (Table. 4)。肝腎のGPxの活性低下と腎臓の α -トコフェロールの減少が抑制された (Table. 3)。

【考察】血中逸脱酵素の上昇からCCl₄による肝腎障害が考えられた。CCl₄肝腎障害の特徴であるタンパク質とPLの低下及びTGの増加が腎臓でみられた為[24][25]、肝臓より腎臓で障害が進行していると考えられた。肝臓と腎臓で過酸化脂質のPLOOHとMDAを定量したところ、腎臓で有意な高まりが確認された。よって腎臓を標的臓器にしたCCl₄酸化ストレス動物モデルが有用であると考えられた。またCCl₄酸化ストレスに対するCPEの抗酸化作用を調べたところ、CPE給与によって腎臓のPLOOHとMDAの増加が抑制された。CPEは*CYP2E1*の活性を抑制する作用が見られたため、CCl₄由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。

Table. 3 Plasma, hepatic and renal biochemical parameters and antioxidants of rat with CCl₄ or not supplemented with or without CPE. Data points represent the mean \pm S.E.M. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

		Non-CCl ₄		CCl ₄	
		Water	CPE	Water	CPE
Plasma	AST (IU/l)	82.80 \pm 6.69	89.40 \pm 3.27	12194.00 \pm 4811.45 [#]	1928.20 \pm 577.92 [*]
	ALT (IU/l)	44.4 \pm 1.5	45.2 \pm 3.2	10440.4 \pm 5641.7 [#]	363.8 \pm 95.0 [*]
	LDH (IU/l)	248.8 \pm 56.1	288.2 \pm 62.8	61722.0 \pm 28616.8 [#]	6750.2 \pm 2242.1 [*]
	UA (mg/dl)	0.9 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1 [*]	8.1 \pm 2.9 [#]	2.3 \pm 0.3 [*]
Liver	Protein (mg/g)	191.0 \pm 24.0	216.3 \pm 22.3	219.7 \pm 12.4	202.4 \pm 17.9
	Triglyceride (mg/g)	6.1 \pm 0.8	7.4 \pm 0.9	4.9 \pm 0.1	7.2 \pm 1.7
	Phospholipid (μ g/g)	1035.8 \pm 109.5	967.3 \pm 69.6	963.2 \pm 65.5	827.8 \pm 38.3
	α -tocopherol (ug/mg TG)	1.26 \pm 0.17	1.20 \pm 0.20	0.77 \pm 0.15	0.97 \pm 0.17
	glutathione peroxidase (mU/mg protein)	133.16 \pm 13.24	125.95 \pm 13.26	69.81 \pm 18.17 [#]	141.67 \pm 17.94 [*]
Kidney	Protein (mg/g)	163.6 \pm 9.8	145.8 \pm 5.7	109.1 \pm 9.2 [#]	159.4 \pm 5.6 [*]
	Triglyceride (mg/g)	3.0 \pm 0.5	5.6 \pm 1.5	8.5 \pm 1.2 [#]	4.6 \pm 0.8
	Phospholipid (μ g/g)	977.5 \pm 99.1	941.2 \pm 45.8	745.8 \pm 26.8 [#]	913.4 \pm 58.6 [*]
	α -tocopherol (ug/mg TG)	1.84 \pm 0.33	2.47 \pm 0.14	0.78 \pm 0.10 [#]	1.97 \pm 0.36 [*]
	glutathione peroxidase (mU/mg protein)	48.95 \pm 2.12	53.29 \pm 4.58	30.45 \pm 4.92 [#]	50.78 \pm 2.26 [*]

Table. 4 Gene expression of *CYP2E1* rat with CCl₄ or not supplemented with or without CPE

		Non-CCl ₄		CCl ₄	
		Water	CPE	Water	CPE
Liver		1.00 \pm 0.10	0.75 \pm 0.09	0.20 \pm 0.07 [#]	0.63 \pm 0.11 [*]
Kidney		1.00 \pm 0.15	1.25 \pm 0.05	0.55 \pm 0.09 [#]	0.97 \pm 0.10 [*]

Data points represent the mean \pm SEM. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

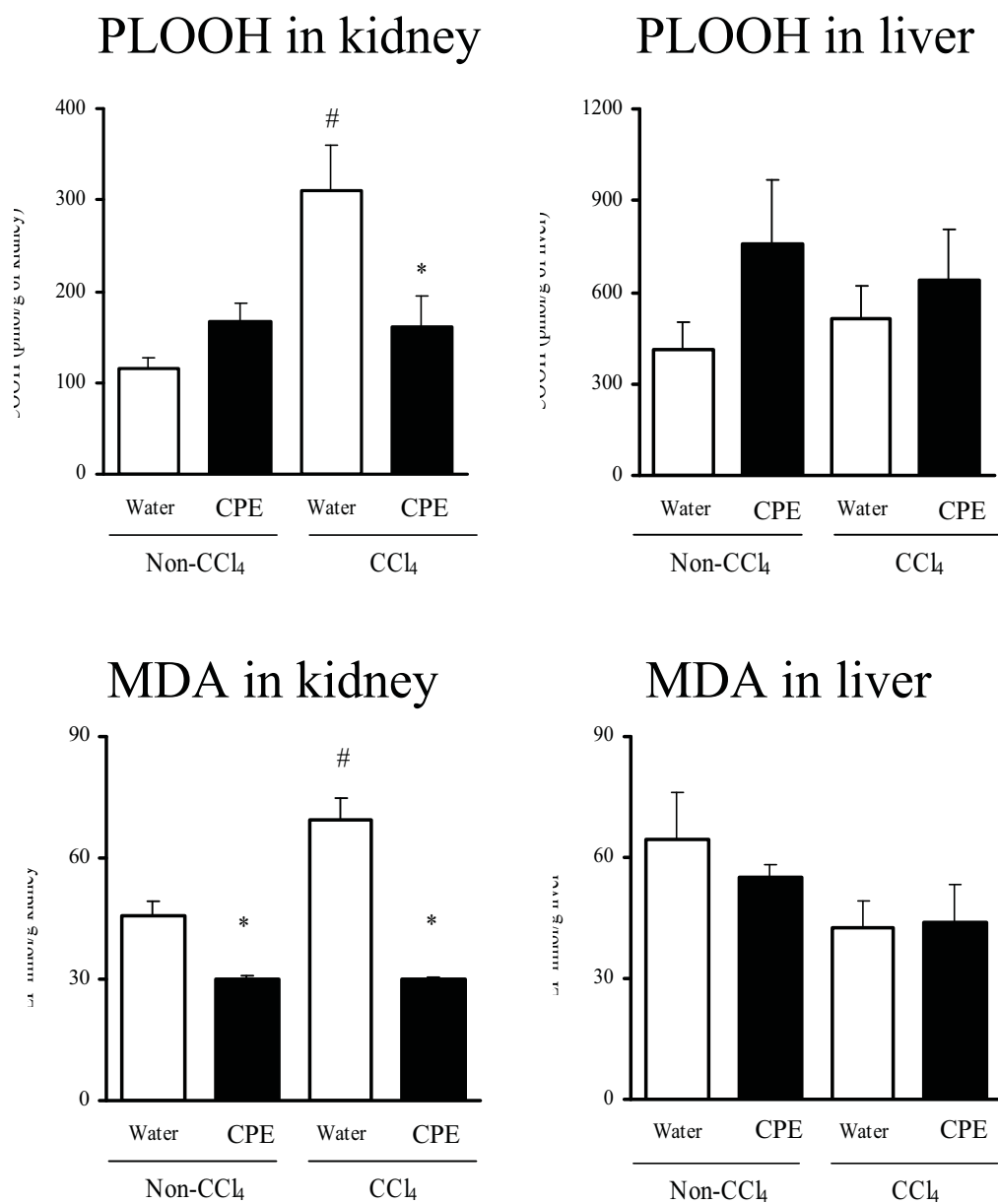


Fig. 6 Levels of PLOOH and TBARS in the liver of rats with CCl₄ or not supplemented with or without cacao polyphenol. Data points represent the mean \pm S.E.M. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

総括

本博士論文の目的は、CL-HPLC 法により高選択的に定量した PLOOH を指標に酸化ストレス動物モデルを確立し、CPE の生体内抗酸化作用を明らかにすることである。

第1章ではアルコール含有液体飼料によるラット脂肪肝の酸化ストレスを評価した。アルコール性脂肪肝に特徴的な症状である肝臓 TG の蓄積とレチノールの減少が確認できたので、アルコール性脂肪肝モデルが作成できたと考えられた。アルコール摂取初期では酸化ストレスをあまり伴わずに脂肪肝が形成され、その後に α -トコフェロールの減少や PLOOH の増加を伴う酸化ストレスが発生し、病状が進展する可能性が考えられた。このことから、液体飼料を8週間投与したラットのアアルコール性脂肪肝は酸化ストレス動物モデルに適用できると考えられた。CPE を給与すると、レチノールの減少は抑制できなかったが、 α -トコフェロールの減少と PLOOH の増加が抑制されたので、CPE が生体内で抗酸化作用を発揮したと考えられた。この作用は CPE が直接的に抗酸化力を発揮したというよりも、肝臓への TG の蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減している可能性が考えられた。

第2章では NASH モデルマウス肝臓の酸化ストレスを評価した。NASH 群の脂肪肝は TG 量で $54.8 \pm 5.4 \text{ mg/g liver}$ を示し、第1章のアアルコール性脂肪肝 ($25.9 \pm 3.9 \text{ mg/g liver}$) よりも病状は更に進行したと考えられたが、PLOOH と TBA の高まりは確認できなかった。肝臓中の TG 量と過酸化脂質量が関連しなかったことから、アルコールと高脂肪食を組み合わせたアルコール投与ラットの方が、本 NASH モデルマウスよりも肝臓の *CYP2E1* が強く活性化され、脂質過酸化を増加させた可能性が考えられた。NASH モデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適応するには、更に病状を進展させてから検証する必要があると考えられた。

第3章では CCl_4 腹腔内投与2時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを評価し、 CCl_4 酸化ストレス動物モデルの最適な標的臓器を明らかにしようとした。肝臓と腎臓で過酸化脂質の PLOOH と MDA を定量したところ、腎臓で有意な高まりが確認された。よって腎臓を標的臓器にした CCl_4 酸化ストレス動物モデルが有用であると考えられた。また CCl_4 酸化ストレスに対する CPE の抗酸化作用を調べたところ、CPE 給与によって腎臓の PLOOH と MDA の増加が抑制された。CPE は *CYP2E1* の活性を抑制する作用が見られたため、 CCl_4 由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。

本研究ではアルコール含有液体飼料投与8週間後のラット脂肪肝と、 CCl_4 腹腔内投与2時間後のラット腎臓が酸化ストレス動物モデルとして有用であることを明らかにした。これらの酸化ストレス動物モデルを食品成分の生体内抗酸化作用の評価に活用することで、酸化ストレスが憎悪の原因となる生活習慣病の予防に資する食品成分の機能性解明に貢献できると考えられる。また本研究で CPE のアルコール摂取による脂肪肝を緩和させる作用と、腎臓への生体内抗酸化作用を初めて明らかにすることができた。今後 CPE の吸収性・代謝動態について更に検証を進めることで、CPE は抗酸化作用をもつ機能性食品素材として国民の健康向上に貢献できると考えられる。

引用文献

- [1] Hermans N, Cos P, Maes L, De Bruyne T, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, Pieters L. Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Curr Med Chem.* **14**, 417-430 (2007).
- [2] Yamagishi M, Osakabe N, Takizawa T, Osawa T. Cacao liquor polyphenols reduce oxidative stress without maintaining α -tocopherol levels in rats fed a vitamin E-deficient diet. *Lipids.* **36**, 67-71 (2001)
- [3] Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol* **24**, 197-211 (1989)
- [4] Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* **11**, 376-381 (1995)
- [5] Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol.* **46**, 141-152 (2013)
- [6] Somayajulu-Nițu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* **27**, 1471-2202 (2009)
- [7] Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plataras J, Roberts LJ 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* **38**, 698-710 (2005)
- [8] Rauchová H, Vokurková M, Koudelová J. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res.* **61**, 89-101 (2012)
- [9] Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature.* **424**, 1013 (2003)
- [10] Seigo B, Naomi O, Yoji K, Midori N, Akiko Y, Toshimi K, Kumiko F, Yuko M, and Kazuo K. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans^{1,2} *Am J Clin Nutr.* **85**, 709-717 (2007)
- [11] Feinman L, Lieber CS. Ethanol and lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* **70**, 791-792 (1999)
- [12] Situnayake RD, Crump BJ, Thurnham DI, Davies JA, Gearty J, Davis M. Lipid peroxidation

- and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut*. **31**, 1311-1317 (1990)
- [13]Tsukamoto H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*. **10**, 465-467 (1993)
- [14]Schäffer MW, Roy SS, Mukherjee S, Nohr D, Wolter M, Biesalski HK, Ong DE, Das SK. Qualitative and quantitative analysis of retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids out of various internal organs from different species by HPLC. *Anal Methods*. **2**, 1320-1332 (2010)
- [15]Prates J. A. M, Quaresma M. A. G, Bessa R. J. B, Fontes C. M. G. A, Alfaia C. M. P. M. Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry*. **94**, 469-477 (2006)
- [16]Bell LN, Molleston JP, Morton MJ, Klipsch A, Saxena R, Vuppalanchi R, Chalasani N. Hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 2E1 in pediatric nonalcoholic fatty liver disease and its subtypes. *J Clin Gastroenterol*. **45**, 800-807 (2011)
- [17]Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. **105**, 1067-1075 (2000)
- [18]Khoschsorur G. A, Winklhofer-Roob B. M, Rabl H, Auer Th, Peng Z, Schaur R. J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*. **52**, 181-184 (2000)
- [19]Hartmut J, Gregory J.G, Arthur I.C, Jack A.H, Dominique P, John J. L. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci*. **65**, 166-176 (2002)
- [20]Heebøll S, Thomsen KL, Pedersen SB, Vilstrup H, George J, Grønæk H. Effects of resveratrol in experimental and clinical non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. **6**, 188-198 (2014)
- [21]Nakajima T, Ikatsu H, Okino T, Wang RS, Murayama N, Yonekura I, Sato A. Enhancement of ethanol-induced lipid peroxidation in rat liver by lowered carbohydrate intake. *Biochem Pharmacol*. **43**, 245-250 (1992)
- [22]Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*. **189**, 113-127 (2003)
- [23]Ruprah M, Mant TG, Flanagan RJ. Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: implications for diagnosis and treatment. *Lancet*. **1**, 1027-1029 (1985)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	鈴木 晃一郎
審 査 委 員	主査：教授 宮澤 陽夫 副査：教授 桑原 重文 教授 山下 まり 准教授 仲川 清隆
学 位 論 文 題 目	酸化ストレス動物モデルの確立と カカオポリフェノールの 生体内抗酸化作用

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

食品成分の生体内抗酸化作用の検証では、実験動物の生体内酸化ストレスをマロンジアルデヒド(MDA)とチオバルビツール酸の反応物質を比色法で定量した報告が多いが、定性性と定量性の問題点が指摘されており生体内酸化ストレスを正しく評価していない場合がある。本博士論文ではCL-HPLC法により代表的な手法で酸化ストレスを誘発させた実験動物の過酸化リン脂質(PLOOH)を高選択的に定量し酸化ストレス動物モデルの確立を目指した。またカカオポリフェノール(CPE)の生体内抗酸化作用を明らかにした。

第1章ではアルコール含有液体飼料によるラット脂肪肝の酸化ストレスを評価した。アルコール性脂肪肝に特徴的な肝臓中性脂肪(TG)の蓄積とレチノールの減少が確認できた。アルコール摂取初期では酸化ストレスを伴わずに脂肪肝が形成され、その後に α -トコフェロールの減少やPLOOHの増加を伴う酸化ストレスが発生し病状が進展することを明らかにした。CPEは直接的に抗酸化

力を発揮したというより、肝臓へのTG蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減した可能性を見出した。

第2章ではSTZ誘導性NASHモデルマウス肝臓の酸化ストレスを評価した。NASH群の脂肪肝は第1章のアルコール性脂肪肝より病状は更に進行したが、PLOOHとMDAの高まりは確認できなかった。高脂肪食投与のみよりアルコールと高脂肪食を組み合わせた方が、肝臓のCYP2E1を強く活性化し活性酸素を発生させることを見出した。

第3章ではCCl₄腹腔内投与2時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを評価した。肝臓と腎臓で過酸化脂質のPLOOHとMDAを定量したところ、腎臓で有意な高まりを確認した。CPE給与によって腎臓のPLOOHとMDAの増加の抑制を見出した。CPEはCCl₄を代謝しラジカル生成するCYP2E1の活性を抑制する作用が認められ、CCl₄由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮する経路を明らかにした。

本博士論文ではアルコール含有液体飼料によるラット脂肪肝と、CCl₄腹腔内投与2時間後のラット腎臓で過酸化脂質が有意に増加することを高選択的に定量し、酸化ストレス動物モデルとしての有用性を示した。またCPEのアルコール摂取による脂肪肝を緩和させる作用と、腎臓への生体内抗酸化作用を初めて明らかにした。これら酸化ストレス動物モデルを食品成分の生体内抗酸化作用の評価に活用することで、生活習慣病の予防に資する食品成分の機能性解明に貢献できる。よって審査員一同は博士(農学)の学位に値するものと認定した。